

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 699–703

Enzym-immunologische Tests:

Aktivitätsbestimmung von Peroxidase mit Hilfe des „Trinder-Reagens“

Von H. Gallati

Diagnostische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG Basel

(Eingegangen am 25. Mai/18. Juli 1977)

Zusammenfassung: Für die meisten bisher bekannten enzym-immunologischen Tests wird als Markierungsenzym die Peroxidase aus Meerrettich benützt.

Zur Aktivitätsbestimmung kleinster Peroxidasmengen wird eine neue Testmethode beschrieben, welche die H_2O_2 -Inaktivierung der Peroxidase weitgehend verhindert und dadurch wesentlich längere Inkubationszeiten zuläßt. Bei Anwesenheit von 25 mmol/l Phenol, 2 mmol/l 4-Amino-antipyrin und 0,8 mmol/l H_2O_2 katalysiert die Peroxidase die Bildung des roten Chinonimin-Farbstoffes, dessen Absorptionszunahme pro Zeiteinheit der katalytischen Konzentration des Enzyms direkt proportional ist.

Enzyme-immunological tests:

Determination of the activity of peroxidase with the aid of the "Trinder reagent"

Summary: Most of the currently used enzyme-immunological tests employ horse radish peroxidase as a marker enzyme. A new method is described for the determination of extremely small quantities of peroxidase. This largely prevents the inactivation of the peroxidase by H_2O_2 and thereby permits a much longer incubation time. In the presence of 25 mmol/l phenol, 2 mmol/l 4-amino-antipyrin and 0.8 mmol/l H_2O_2 , peroxidase catalyses the formation of a red quinonimine, whose increase in absorption is directly proportional to the enzyme concentration.

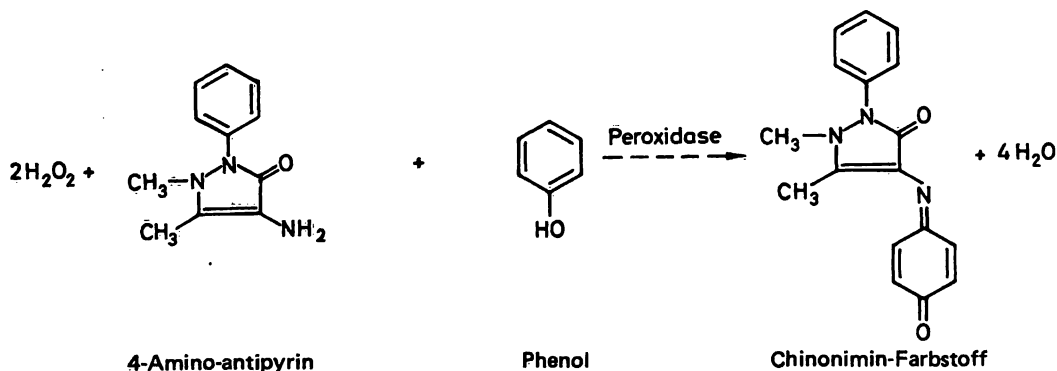
Einleitung

Für die meisten enzym-immunologischen Bestimmungen wird als Markierungsenzym die Peroxidase aus Meerrettich (Donor: hydrogenperoxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7) eingesetzt, da dieses Enzym leicht erhältlich ist, eine hohe spezifische Aktivität aufweist, gegenüber den meisten chemischen Kopplungsreagenzien resistent ist, eine gute Lagerstabilität besitzt und als relativ kleines Proteinmolekül (MG = 40' 000) leicht von der ans Antigen oder den Antikörper gebundenen Peroxidase abgetrennt werden kann.

Peroxidase bildet mit H_2O_2 einen stabilen, enzymatisch inaktiven Komplex, so daß während der katalytischen

Reaktion immer weniger Peroxidase in aktiver Form vorhanden ist (1–3). Diese H_2O_2 -Inaktivierung der Peroxidase kann durch die gebräuchlichen Wasserstoff-Donatoren (z. B. *o*-Dianisidin, *o*-Toluidin, Guajacol oder 2,6-Dichlorphenolindophenol) nicht verhindert werden.

Spektroskopische Untersuchungen haben ergeben, daß Phenol eine hohe Affinität zur Peroxidase besitzt (4–6). Auf Grund dieser Ergebnisse war abzuklären, ob durch die Bildung dieses Phenol-Peroxidase-Komplexes das Enzym vor der H_2O_2 -Inaktivierung geschützt werden kann. Phenol wird unter Einwirkung der Peroxidase und H_2O_2 mit dem 4-Amino-antipyrin zu einem roten Chinonimin-Farbstoff der folgenden Struktur (7) kondensiert:



In der vorliegenden Ausgabe werden zur Optimierung dieser neuen Aktivitätsbestimmungsmethode die Einflüsse der einzelnen Komponenten auf die Peroxidase-Aktivität untersucht.

Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien waren analysenrein. Die Peroxidase aus Meerrettich wurde von Boehringer Mannheim, das 4-Amino-antipyrin (4-Amino-1,5-dimethyl-2-phenyl-3-pyrazolon, 4-Aminophenazon) und das Rinder-Albumin von Fluka, Schweiz, das Human-Globulin vom SRK in Bern und das Brij-35 von Merck bezogen.

Zur Aktivitätsbestimmung der Peroxidase wurden 2,0 ml Testlösung mit 0,1 ml Peroxidaselösung vermischt und bei der Wellenlänge 492 nm die Absorptionsdifferenz pro Zeiteinheit bestimmt. Dabei war es vor allem wichtig, mit geringen Peroxidasekonzentrationen die Aktivität über eine längere Zeitdauer zu verfolgen, um festzustellen, ob und wie weit unter den gegebenen Testbedingungen das Enzym vor der Inaktivierung durch H_2O_2 geschützt werden kann. Die Zusammensetzung der Testlösung wird bei den einzelnen Versuchen speziell erwähnt.

Resultate

Einfluß des Puffersystems und des pH auf die Peroxidase-Aktivität

Bei pH 7,25 haben die Puffersysteme Natriumphosphat, Kaliumphosphat und Tris/HCl im Konzentrationsbereich von 50–200 mmol/l keinen Einfluß auf die Aktivität der Peroxidase noch auf die Stabilität des Enzyms während der katalytischen Reaktion.

Mit Phenol und 4-Amino-antipyrin als Reaktionspartner liegt das pH-Optimum der Peroxidase-Aktivität unter den gegebenen Testbedingungen beim pH 7,25 (Abb. 1). Im sauren pH-Bereich (pH 4–6) wird die Absorptionzunahme pro Zeiteinheit während der katalytischen Reaktion immer geringer.

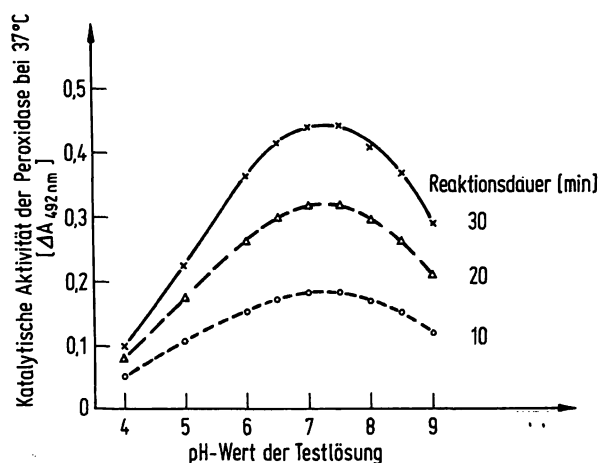


Abb. 1. pH-Aktivitätskurve der Peroxidase in Abhängigkeit zur Reaktionsdauer.

Aktivitätsbestimmung der Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer mit 25 mmol/l Phenol, 2 mmol/l 4-Amino-antipyrin und 0,8 mmol/l H_2O_2 bei 37°C und den entsprechenden pH-Werten.

Einfluß der Phenolkonzentration auf die Peroxidase-Aktivität

Die Michaeliskonstante der Peroxidase für Phenol bei Anwesenheit von 2 mmol/l 4-Amino-antipyrin und 0,8 mmol/l H_2O_2 in 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer vom pH 7,25 beträgt 11,3 mmol/l. Das Substratoptimum für die Aktivitätsbestimmung der Peroxidase wird bei einer Phenolkonzentration von 25 mmol/l erreicht. Phenol in noch höherer Konzentration in der Testlösung hemmt unter den gegebenen Testbedingungen die Peroxidase.

Einfluß der H_2O_2 -Konzentration auf die Peroxidase-Aktivität

In Abbildung 2 sind die Farbentwicklungskurven für die Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen bei sonst identischen Testbedingungen über eine Zeitdauer von 60 Minuten aufgezeichnet. Bei allen untersuchten H_2O_2 -Konzentrationen flacht im Laufe der enzymatischen Reaktion die Farbentwicklungskurve leicht ab.

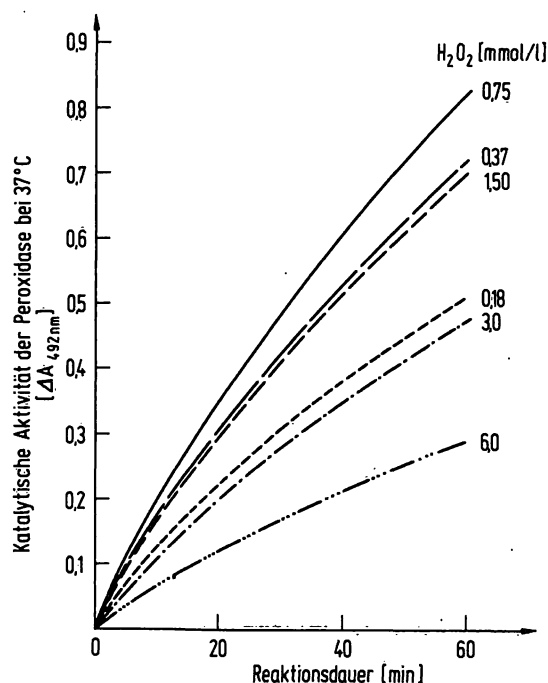


Abb. 2. Reaktionsverlauf der Peroxidase-Aktivität in Abhängigkeit zur H_2O_2 -Konzentration.

Aktivitätsbestimmung der Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer vom pH 7,25 mit 25 mmol/l Phenol, 2 mmol/l 4-Amino-antipyrin und verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen bei 37°C.

Die Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität von der H_2O_2 -Konzentration ist in Abbildung 3 nach der Darstellungsweise von Lineweaver–Burk dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die Michaeliskonstante für H_2O_2 unter den gewählten Testbedingungen 0,25 mmol/l beträgt und daß die Peroxidase ihr Aktivitätsoptimum bei einer

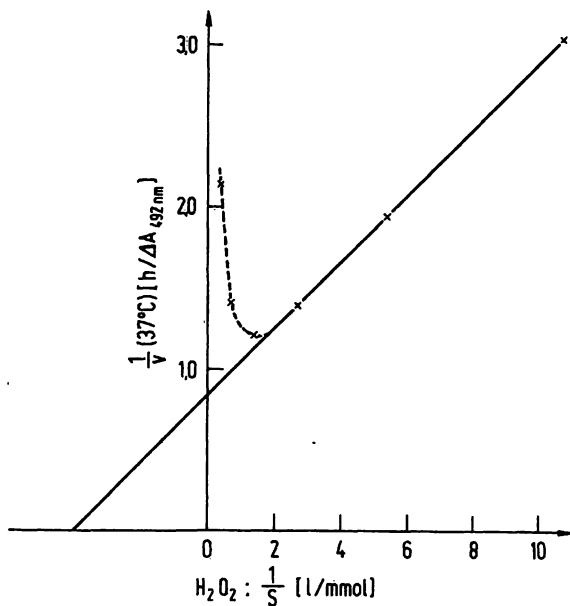


Abb. 3. Michaeliskonstante der Peroxidase für H_2O_2 .
Aktivitätsbestimmung der Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer vom pH 7,25 mit 25 mmol/l Phenol, 2 mmol/l 4-Amino-antipyrin und verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen. Darstellung nach Lineweaver-Burk.

H_2O_2 -Konzentration zwischen 0,6 bis 1,0 mmol/l erreicht. Mit weniger H_2O_2 in der Testlösung wird das Enzym nicht vollständig gesättigt, während ein höherer H_2O_2 -Gehalt die Peroxidase-Aktivität hemmt.

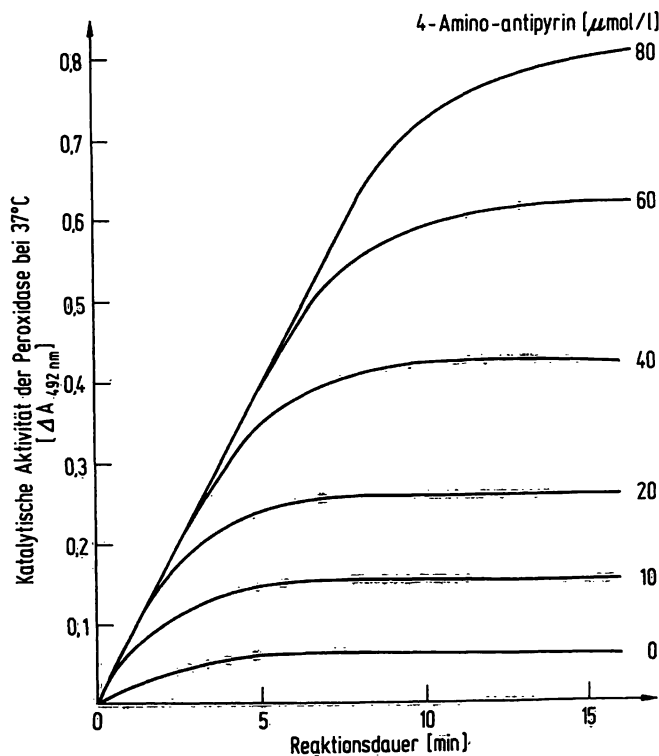


Abb. 4. Peroxidase-Aktivität bei Anwesenheit geringer Mengen an 4-Amino-antipyrin.
Aktivitätsbestimmung der Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer vom pH 7,25 mit 25 mmol/l Phenol, 0,8 mmol/l H_2O_2 und verschiedenen Konzentrationen an 4-Amino-antipyrin bei 37°C.

Einfluß der 4-Amino-antipyrin-Konzentration auf die Peroxidase-Aktivität

Die Aktivität der Peroxidase wird von 4-Amino-antipyrin bis zu einer Konzentration von 10 mmol/l nicht beeinflusst. Auch mit sehr geringen Mengen an 4-Amino-antipyrin in der Testlösung zeigt die Peroxidase volle Aktivität bis zur Erschöpfung des 4-Amino-antipyrins als Reaktionspartner (Abb. 4). Die Farbintensität des gebildeten Chinonimin-Farbstoffes ist unter den gegebenen Testbedingungen der eingesetzten Konzentration an 4-Amino-antipyrin direkt proportional, so daß daraus der mikromolare Absorptionskoeffizient des gebildeten Chinonimin-Farbstoffes (A_{492} : 9,0 $cm^2/\mu mol$) bestimmt werden kann.

Für 4-Amino-antipyrin läßt sich keine Michaeliskonstante berechnen. Es ist daher anzunehmen, daß 4-Amino-antipyrin während der katalytischen Reaktion keinen Komplex mit der Peroxidase bildet, sondern sich „nur“ als Reaktionspartner dem durch H_2O_2 und Peroxidase aktivierten Phenol zur Kondensation anbietet.

Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Peroxidase-Aktivität

Im untersuchten Temperaturbereich von 15°C bis 40°C erhöht sich unter den gegebenen Testbedingungen die Peroxidase-Aktivität um 16% pro 1°C Temperatursteigerung. Bei all diesen Inkubationstemperaturen ist während der Reaktionsdauer von 20 Minuten keine stärkere Abflachung der Farbentwicklungskurve festzustellen, so daß angenommen werden kann, daß in diesem Temperaturbereich die H_2O_2 -bedingte Inaktivierung der Peroxidase nicht signifikant beschleunigt wird.

Einfluß von Serum-Protein auf die Aktivität der Peroxidase

Human-Globulin bis zu einer Konzentration von 2,5 g/l im Testansatz hat keinen Einfluß auf die Peroxidase-Aktivität (Abb. 5). Höhere Globulinkonzentrationen hemmen die Peroxidase-Aktivität stark und beschleunigen zugleich auch die Inaktivierung des Enzyms während der katalytischen Reaktion.

In ähnlicher Weise wird die Peroxidase-Aktivität mit Rinderserum-Albumin gehemmt. Diese Hemmung durch Albumin kann durch Variation der H_2O_2 - wie auch der 4-Amino-antipyrin-Konzentration in der Testlösung nicht vermindert oder aufgehoben werden. Auch ein Zusatz verschiedener Konzentrationen von NaCl oder Brij-35 haben keinen Einfluß auf die Albuminhemmung. Hingegen nimmt die Michaeliskonstante der Peroxidase für Phenol (Abb. 6) mit steigender Albuminkonzentration zu (mit 30 g/l Albumin im Testansatz: K_m = 50 mmol/l; mit 15 g/l Albumin: K_m = 25 mmol/l; mit 7,5 g/l Albumin: K_m = 17 mmol/l; mit 3,75 g/l Albumin: K_m = 13 mmol/l und ohne Albumin: K_m = 11,3 mmol/l). Die maximal mögliche Peroxidase-Aktivität ist bei allen Albuminkonzentrationen die selbe, sofern die Phenolkonzentration entsprechend gesteigert werden kann.

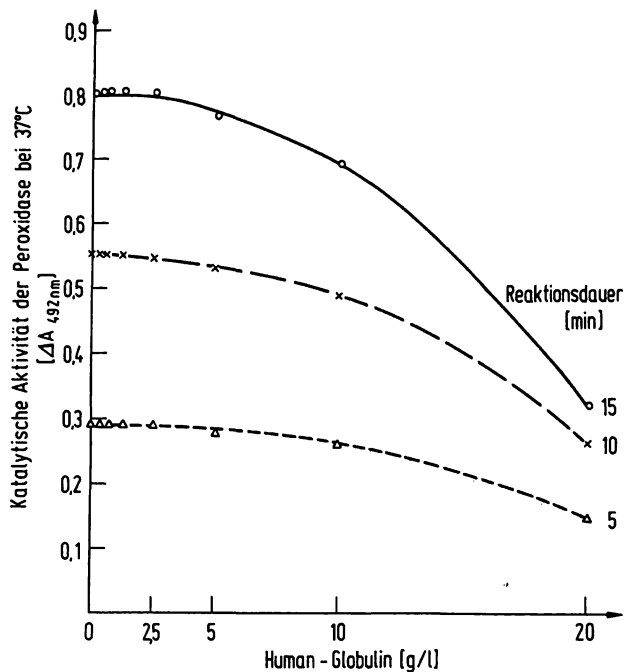


Abb. 5. Einfluß von Human-Globulin auf die Peroxidase-Aktivität. Aktivitätsbestimmung der Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer mit 25 mmol/l Phenol, 2 mmol/l 4-Amino-antipyrin, 0,8 mmol/l H_2O_2 und verschiedenen Konzentrationen an Human-Globulin bei 37°C. Nach 5, 10 und 15 Minuten wurde $A_{492\text{ nm}}$ bestimmt.

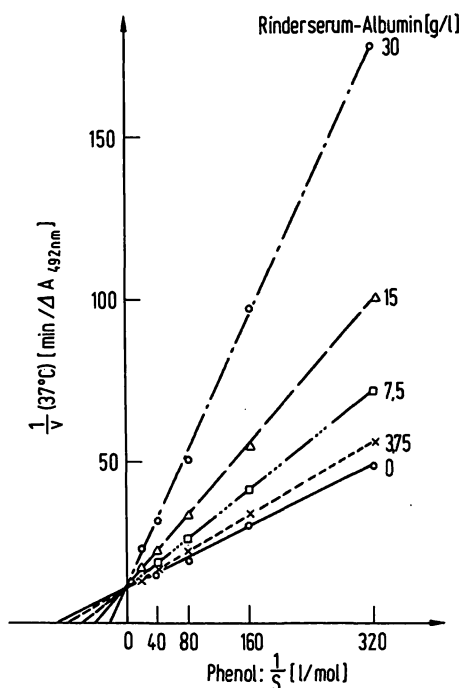


Abb. 6. Michaeliskonstante der Peroxidase für Phenol in Abhängigkeit der Rinderserum-Albuminkonzentration. Aktivitätsbestimmung der Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer vom pH 7,25 mit 2 mmol/l 4-Amino-antipyrin und 0,8 mmol/l H_2O_2 mit verschiedenen Konzentrationen an Phenol und Rinderserum-Albumin. Darstellung nach Lineweaver-Burk.

Testvorgehen zur Aktivitätsbestimmung der Peroxidase

Die Substrat-Pufferlösung (pH 7,25) enthält in 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer 25 mmol/l Phenol und 2 mmol/l 4-Amino-antipyrin. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur mindestens 1 Monat haltbar, wobei das Auftreten einer schwachen Rosafarbe die Aktivitätsbestimmung der Peroxidase nicht beeinträchtigt.

Die gebrauchsfertige Testlösung muß täglich frisch angesetzt werden, indem die Substrat-Pufferlösung mit 0,8 mmol/l H_2O_2 ergänzt wird.

Zur Aktivitätsbestimmung der Peroxidase werden 2,0 ml Testlösung mit 0,1 ml Probe vermischt und bei 37°C die Absorptionszunahme pro Zeiteinheit bei der Wellenlänge 492 nm bestimmt. Mit diesem Wert kann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des mikromolaren Absorptionskoeffizienten (A_{492} : $9,0\text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) die Peroxidase-Aktivität berechnet werden.

Ist die Peroxidase in der zu bestimmenden Probe gering, so kann die Relation: Ansatzvolumen zu Probevolumen bei entsprechender Korrektur der Zusammensetzung der Testlösung verändert werden.

Muß die Peroxidase-Aktivität in einer proteinreichen Probe bestimmt werden, wird mit Vorteil die Phenolkonzentration entsprechend dem Proteingehalt im Testansatz erhöht (cf. Abb. 6).

Die enzymatische Reaktion der Peroxidase kann durch Zumischen des Enzyms (Probe) oder einer entsprechenden Menge H_2O_2 gestartet werden. Hingegen darf die Peroxidase nicht mit H_2O_2 allein oder mit H_2O_2 und Phenol vorinkubiert werden, da schon nach 1–3 Minuten in diesem phosphatgepufferten Milieu vom pH 7,25 die Peroxidase vollständig inaktiviert wird.

Diskussion

Die Peroxidase aus Meerrettich katalysiert bei Anwesenheit von H_2O_2 , Phenol und 4-Amino-antipyrin die Bildung des roten Chinonimin-Farbstoffes. Die Absorptionszunahme pro Zeiteinheit ist der Peroxidase-Konzentration direkt proportional.

Auf Grund der hier mitgeteilten kinetischen Daten wird bei der enzymatischen Reaktion H_2O_2 und Phenol komplex an die Peroxidase gebunden. Für diese beiden Substrate können dementsprechend auch die Michaeliskonstanten berechnet werden. Für das 4-Amino-antipyrin ist hingegen keine Affinität zur Peroxidase festzustellen, sodaß angenommen werden kann, daß das „enzymatisch aktivierte“ Phenol sich spontan und ohne weitere enzymatische „Vermittlung“ mit dem 4-Amino-antipyrin zum Chinonimin-Farbstoff kondensiert. Es scheint auch, daß bei einem Überschuß an Phenol und H_2O_2 das 4-Amino-antipyrin vollständig umgesetzt wird, was einerseits die Berechnung des mikromolaren Absorptionskoeffizienten ermöglicht und andererseits eine einfache

Methode zur quantitativen Bestimmung des 4-Amino-antipyrins ergibt.

Auch mit Phenol als Reaktionspartner ist die Konzentration an H_2O_2 für die Peroxidase-Aktivitätsbestimmung kritisch. Zwar schützt Phenol die Peroxidase weitgehend vor der H_2O_2 -Inaktivierung; es besteht aber auch bei dieser Bestimmungsmethode ein relativ eng begrenztes H_2O_2 -Substratoptimum. Deshalb ist zur Erreichung richtiger und reproduzierbarer Resultate bei der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung die H_2O_2 -Konzentration in der Testlösung möglichst genau einzuhalten.

Protein hemmt die Peroxidase-Aktivität. Diese Hemmung steigt mit zunehmender Albuminkonzentration und abnehmendem Phenolgehalt im Testansatz. Dabei wirkt Albumin wie ein kompetitiver Inhibitor (cf. Abb. 6).

Wird die Peroxidase mit H_2O_2 und Phenol in Natriumphosphat-gepuffertem (pH 7,25) Milieu vorinkubiert und die enzymatische Reaktion durch Zumischen von 4-Amino-antipyrin gestartet, so ist keine Farbentwick-

lung festzustellen. Dieses Phänomen kann auf Grund der Resultate von Danner et al. (5) erklärt werden, wonach die Peroxidase unter Einwirkung von H_2O_2 das Phenol enzymatisch aktiviert, so daß es zum *o,o'*-Diphenol kondensiert. *o,o'*-Diphenol besitzt aber eine um 450 mal stärkere Affinität zur Peroxidase als das Phenol, sodaß diese Substanz einen äußerst starken, kompetitiven Inhibitor gegenüber der Peroxidase darstellt.

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität ist es möglich, kleinste Enzymmengen durch entsprechend lange Inkubationsdauer bei erhöhter Reaktionstemperatur quantitativ zu bestimmen und damit eine für die enzym-immunologischen Tests notwendige Sensibilität zu erreichen.

Danksagung

Der Autor dankt Frau Dr. R. Baumgartner für die wertvolle Unterstützung bei der wissenschaftlichen Dokumentation sowie Frl. H. Dettmar für die gewissenhafte Durchführung der praktischen Versuche.

Literatur

1. Maehly, A. C. (1955), Plant Peroxidase in Methods in Enzymology (Colowick, S. & Kaplan, N., eds.) New York, Bd. 2, S. 801–813.
2. Yamazaki, I., Yokota, K. & Nakajima, R. (1965), in „Oxidases Related Redox Systems“ (King, T., Mason, H. & Morrison, M. eds.), New York, S. 485–504.
3. Shindler, J., Childs, R. & Bardsley, W. (1976), Eur. J. Biochem. 65, 325–331.
4. Critchlow, J. E. & Dunford, H. B. (1973), in „Oxidases and Related Redox Systems“ (King, T. E., Mason, H. S. & Morrison, M., eds.), S. 355–373, University Park Press, Baltimore, Md.
5. Danner, D. J., Brignac, P. J., Arceneaux, D. & Patel, V. (1973), Arch. Biochem. Biophys. 156, 759–763.
6. Schonbaum, G. R. (1973), J. Biol. Chem. 248, 502–511.

Dr. H. Gallati
Diagnostische Forschungsabteilung
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG
Grenzacherstr. 124
CH-4002 Basel

